

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

21.08.03

REC'D 10 OCT 2003

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2002年 8月22日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2002-242259  
[ST. 10/C]: [JP2002-242259]

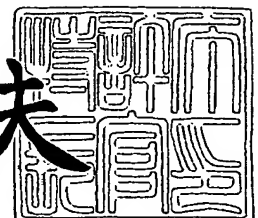
出 願 人  
Applicant(s): 株式会社ジェネティックラボ  
松田 彰

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月25日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

出 証 票 号 出 証 日 2003-09-25

【書類名】 特許願

【整理番号】 PGL-0003

【提出日】 平成14年 8月22日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C17H

【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市北区北 1 2 条西 6 丁目 北海道大学大学院  
薬学研究科機能分子設計学講座薬化学分野内

【氏名】 加藤 優佳

【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市北区北 1 2 条西 6 丁目 北海道大学大学院  
薬学研究科機能分子設計学講座薬化学分野内

【氏名】 南川 典昭

【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市北区北 1 2 条西 6 丁目 北海道大学大学院  
薬学研究科機能分子設計学講座薬化学分野内

【氏名】 松田 彰

【特許出願人】

【識別番号】 301023364

【氏名又は名称】 株式会社ジェネティックラボ

【特許出願人】

【住所又は居所】 北海道札幌市北区北 1 2 条西 6 丁目 北海道大学大学院  
薬学研究科機能分子設計学講座薬化学分野内

【氏名又は名称】 松田 彰

【代理人】

【識別番号】 230104019

【弁理士】

【氏名又は名称】 大野 聖二

【電話番号】 03-5521-1530

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100106840

【弁理士】

【氏名又は名称】 森田 耕司

【電話番号】 03-5521-1530

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100105991

【弁理士】

【氏名又は名称】 田中 玲子

【電話番号】 03-5521-1530

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 185396

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

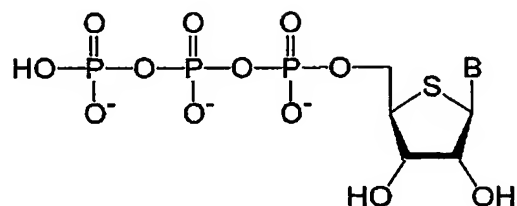
【書類名】 明細書

【発明の名称】 4'-チオヌクレオチド

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 式 I :

【化 1】

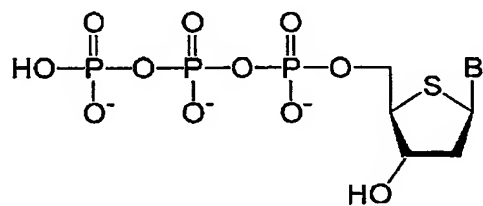


[式中、Bはアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基である]

の化合物。

【請求項 2】 式 II :

【化 2】

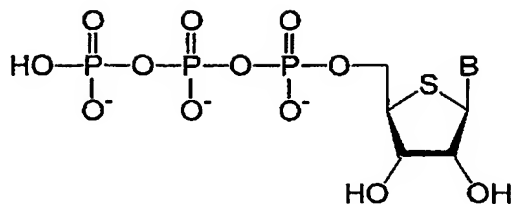


[式中、B' はアデニン、グアニン、シトシン、チミンおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基である]

の化合物。

【請求項 3】 式 I :

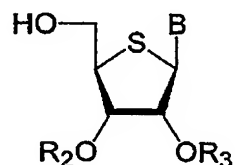
## 【化3】



[式中、Bはアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基である]

の化合物を合成する方法であって、式III:

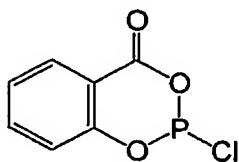
## 【化4】



[式中、Bはアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基であり、R<sub>2</sub>およびR<sub>3</sub>はそれぞれ独立してヒドロキシ基の保護基である]

の化合物を、式IV:

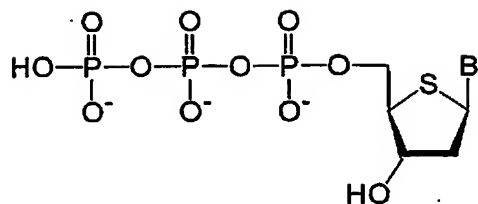
## 【化5】



の化合物と反応させ、得られた中間体をピロリン酸と反応させ、次にヨード酸化、加水分解および脱保護することにより式Iの化合物を得ることを含む方法。

【請求項4】 式II:

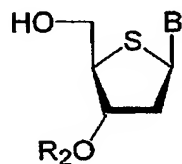
## 【化6】



[式中、Bはアデニン、グアニン、シトシン、チミンおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基である]

の化合物を合成する方法であって、式V：

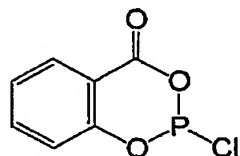
## 【化7】



[式中、Bはアデニン、グアニン、シトシン、チミンおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基であり、R<sub>2</sub>はヒドロキシ基の保護基である]

の化合物を、式I V：

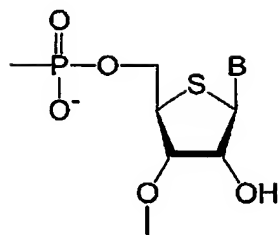
## 【化8】



の化合物と反応させ、得られた中間体をピロリン酸と反応させ、次にヨード酸化、加水分解および脱保護することにより式Vの化合物を得ることを含む方法。

【請求項5】 式V I：

## 【化9】

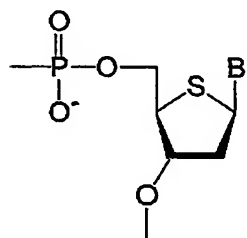


[式中、Bはアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基である]

のヌクレオチド単位を少なくとも1つ含むオリゴヌクレオチドを製造する方法であって、請求項1の化合物または請求項3に記載の方法により製造される化合物の存在下で、RNA合成酵素によりRNA鎖伸長反応を行うことを特徴とする方法。

## 【請求項6】 式VII:

## 【化10】



[式中、Bはアデニン、グアニン、シトシン、チミンおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基である]

のヌクレオチド単位を少なくとも1つ含むオリゴヌクレオチドを製造する方法であって、請求項2の化合物または請求項4に記載の方法により製造される化合物の存在下で、DNA合成酵素によりDNA鎖伸長反応を行うことを特徴とする方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、ヌクレオチド類似体およびその製造方法に関する。より詳細には、

本発明は、4'-チオリボヌクレオチドおよび4'-チオ-2'-デオキシヌクレオチド、これらのヌクレオチド類似体の製造方法、ならびにこれらのヌクレオチド類似体を用いてオリゴヌクレオチドを製造する方法に関する。

#### 【0002】

##### 【従来の技術】

4'-チオヌクレオシドはフラノース環の酸素原子が硫黄原子に置換されたヌクレオシドの総称である。

##### 【化11】



#### 【0003】

4'-チオリボヌクレオシドまたは4'-チオ-2'-デオキシリボヌクレオシドを含むRNAまたはDNAは、種々のヌクレアーゼに対して抵抗性を示すため、研究試薬および診断または治療用の薬剤として有用であることが示唆されている。

#### 【0004】

Bellonら (Biochem. Biophys. Res. Comm., 1992, 184, 797-803) は、1-(4'-チオ-β-D-リボフラノシル)-チミンを含むオリゴデオキシヌクレオチドの合成を記載する。Bellonら (Nucl. Acid Res., 1993, 21, 1587-1593), Leydierら (Antisense Res. Dev. 1995, 5, 167-174) およびLeydierら (Nucleosides Nucleotides, 1995, 14, 1027-1030) は、4'-チオ-β-D-オリゴリボヌクレオチドが高いヌクレアーゼ耐性を有することを記載する。Dukhanら (Nucleosides Nucleotides, 1999, 18 1423-1424) は、4種の4'-チオリボヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチドの合成を記載する。

#### 【0005】

Bellonら (Nucl. Acid Res., 1993, 21, 1587-1593) は、4'-チオウリジンのみからなるRNAの分解酵素に対する抵抗性を調べ、天然型U<sub>6</sub>と比較して、4'-



SU6が種々の分解酵素に対して遙かに強い抵抗性を示すことを報告している。

#### 【0006】

一方、デオキシリボヌクレオシドに関しても、いくつかの合成例が報告されている。Hancoxら (Nucl. Acid Res., 1993, 21, 3485-3491) は、2'-デオキシ-4'-チオチミジンおよびこれを含むオリゴデオキシリボヌクレオチドの合成を記載する。Boggonら (Nucl. Acid Res., 1996, 24, 951-961) は、4'-チオ-2'-デオキシチミジンを含む合成DNAオリゴマーの構造を記載する。Jonesら (Nucl. Acid Res., 1996, 24, 4117-4122) およびJonesら (J. Bioorg. Med. Chem. Lett., 1997, 7, 1275-1278) は、4'-チオ-2'-デオキシヌクレオチドを含む合成DNAオリゴマーを記載する。Kumarら (Nucl. Acid Res., 1997, 25, 2773-2783) は、4'-チオ-2'-デオキシシチジンを含む合成DNAオリゴマーを記載する。

#### 【0007】

しかし、これらのいずれのオリゴリボヌクレオチド、オリゴデオキシリボヌクレオチドも化学合成により製造されている。この方法では、長鎖のオリゴヌクレオチドを得ることは困難であり、かつコストが高い。

#### 【0008】

4'-チオヌクレオシドからRNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼ、リバーストランスクリプターゼ等の酵素を用いてオリゴヌクレオチドを合成するためには、4'-チオヌクレオシドを三リン酸化することが必要である。Alexandrovら (Antiviral Chemistry & Chemotherapy, 1995, 7, 237-242) は、4'-チオ-5'-エチル-2'-デオキシウリジン 5'-三リン酸の合成およびこれがDNA合成酵素により認識されることを記載する。しかし、この特定の塩基以外の4'-チオデオキシリボヌクレオシド三リン酸または4'-チオリボヌクレオシド三リン酸はこれまでに得られていない。これは、立体選択的合成の困難性のためであると考えられる。

#### 【0009】

したがって、当該技術分野においては、RNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼ等の酵素により認識され伸長されることができる4'-チオヌクレオチドを

合成するための新規かつ改良された方法が求められている。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

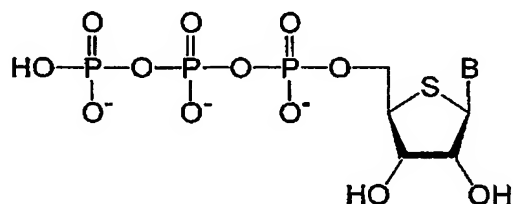
したがって、本発明は、新規ヌクレオシド三リン酸、およびこれを合成する方法、ならびにこれらのヌクレオシド三リン酸を用いてオリゴヌクレオチドを製造する方法を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明は、式 I :

【化12】



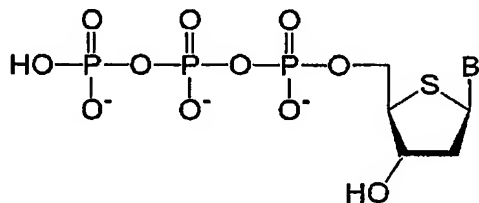
[式中、B はアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基である]

で表される 4' - チオリボヌクレオチドを提供する。

【0012】

本発明はまた、式 II :

【化13】



[式中、B' はアデニン、グアニン、シトシン、チミンおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基である]

で表される 4' - チオ-2' - デオキシヌクレオチドを提供する。

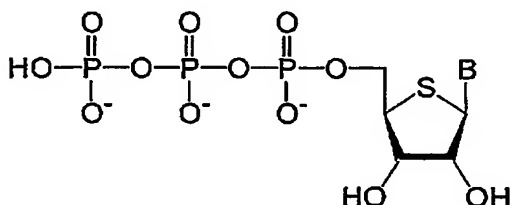
【0013】

本発明の4'-チオヌクレオチド類は、RNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼ等の酵素により認識され伸長されることができるため、ヌクレアーゼに対して抵抗性を有するRNAまたはDNAを合成するためのモノマー単位として有用である。

【0014】

別の観点においては、本発明は、式I：

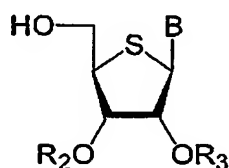
【化14】



[式中、Bはアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基である]

で表される4'-チオリボヌクレオチドを合成する方法を提供する。該方法は、式III：

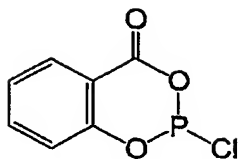
【化15】



[式中、Bはアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基であり、R<sub>2</sub>およびR<sub>3</sub>はそれぞれ独立してヒドロキシ基の保護基である]

の化合物を、式IV：

## 【化16】

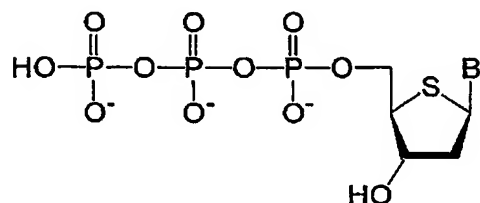


の化合物と反応させ、得られた中間体をピロリン酸と反応させ、次にヨード酸化、加水分解および脱保護することを含む。

## 【0015】

さらに別の観点においては、本発明は、式II：

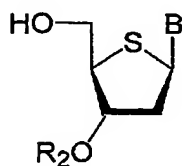
## 【化17】



[式中、Bはアデニン、グアニン、シトシン、チミンおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基である]

で表される4'-チオ-2'-デオキシヌクレオチドを合成する方法を提供する。該方法は、式V：

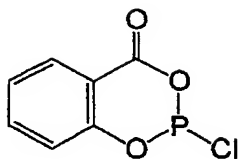
## 【化18】



[式中、Bはアデニン、グアニン、シトシン、チミンおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基であり、R<sub>2</sub>はヒドロキシル基の保護基である]

の化合物を、式IV：

## 【化19】

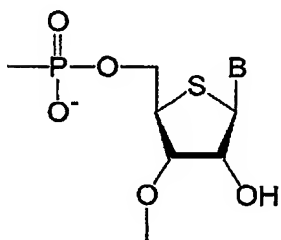


の化合物と反応させ、得られた中間体をピロリン酸と反応させ、次にヨード酸化、加水分解および脱保護することを含む。

## 【0016】

本発明のさらに別の観点においては、本発明は、式VI：

## 【化20】



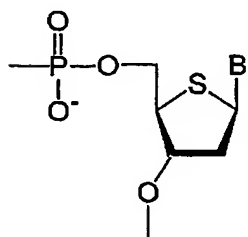
[式中、Bはアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基である]

のヌクレオチド単位を少なくとも1つ含むオリゴヌクレオチドを製造する方法を提供する。該方法は、本発明の4'-チオリボヌクレオチドの存在下で、RNA合成酵素によりRNA鎖伸長反応を行うことを特徴とする。RNA合成酵素としては、RNAポリメラーゼが挙げられる。

## 【0017】

本発明のさらに別の観点においては、本発明は、式VII：

## 【化21】



〔式中、Bはアデニン、グアニン、シトシン、チミンおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基である〕

のヌクレオチド単位を少なくとも1つ含むオリゴヌクレオチドを製造する方法であって、本発明の4'-チオ-2'-デオキシヌクレオチドの存在下で、DNA合成酵素によりDNA鎖伸長反応を行うことを特徴とする。DNA合成酵素としては、DNAポリメラーゼ、リバーストランスクリプターゼ、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼが挙げられる。

#### 【0018】

本発明の方法により製造される、4'-チオリボヌクレオシドまたは4'-チオ-2'-デオキシリボヌクレオシドを含むRNAまたはDNAは、種々のヌクレアーゼに対して抵抗性を示すため、研究試薬および診断または治療用の薬剤として有用である。本発明にしたがえば、酵素を用いてオリゴヌクレオチドを合成することができるため、従来の化学合成方法と比較して、より長い鎖のオリゴヌクレオチドを簡便に製造することができる。

#### 【0019】

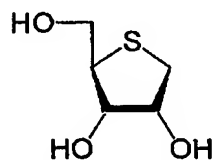
##### 【発明の実施の形態】

本発明のヌクレオシド三リン酸は、公知の4'-チオ糖から出発して、糖に塩基を立体選択的に導入し、次に5'位に選択的にリン酸基を導入することにより製造することができる。

#### 【0020】

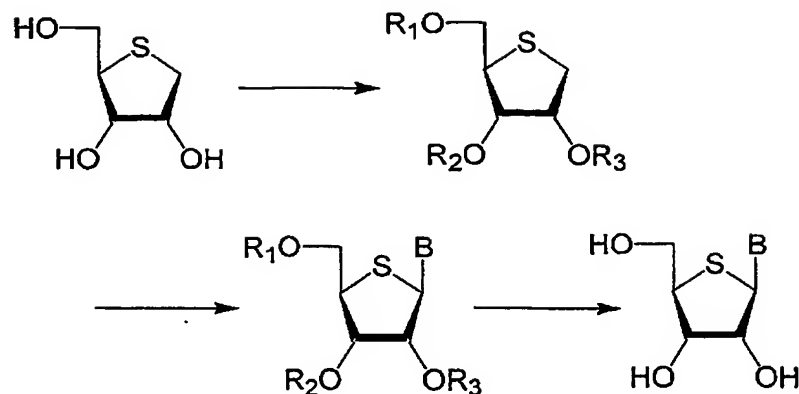
4'-チオウリジンは、4'-チオ糖

##### 【化22】



の2, 3および5位のヒドロキシル基を適切に保護し、プンメラ (Pummerer) 反応を用いて塩基を立体選択的に導入することにより得ることができる。

## 【化 23】



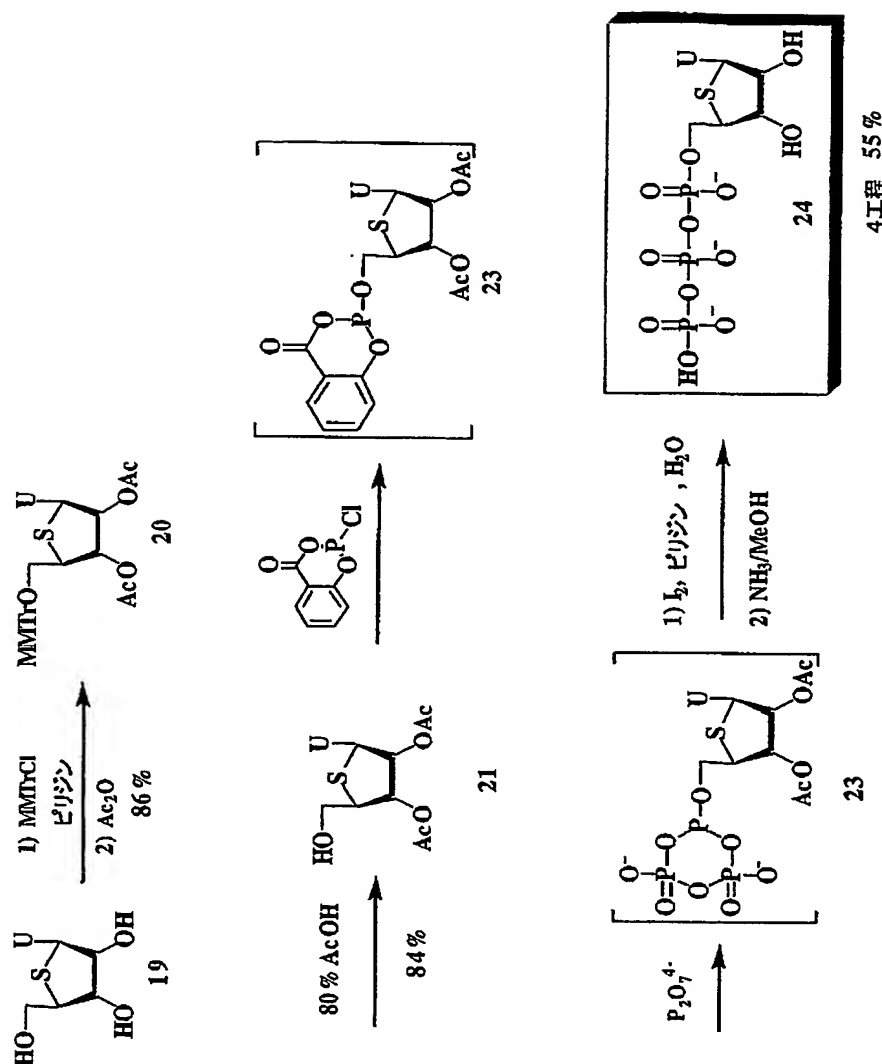
〔式中， $R_1$ ， $R_2$ および $R_3$ は，独立してヒドロキシル保護基であり， $R_1$ と $R_2$ ，および $R_2$ と $R_3$ は一緒になって二官能性のヒドロキシル保護基であってもよい〕。

$R_3$ は，より電子供与性の保護基であるほど立体選択性が向上し，好ましくは2，4-ジメトキシベンゾイル基である。

## 【0021】

プンメラー反応によって得られた18のウリジン誘導体は，フッ化アンモニウム，メチルアミンを用いて脱保護をおこない，19の4'-チオウリジンへと変換することができる。次に，19の4'-チオウリジンより4'-チオUTPを合成する。

【化 24】



【0022】

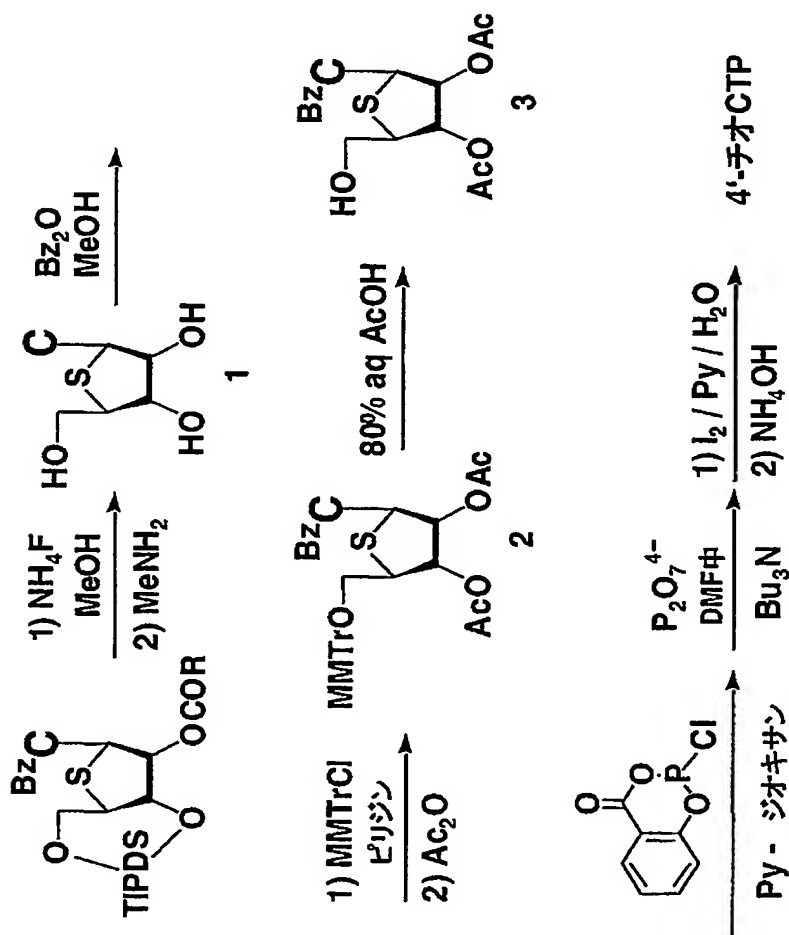
19の化合物の5'位をモノメトキシトリチル化および2', 3'位をアセチル化して化合物20を得る。続いて脱モノメトキシトリチル化を行い, 21のアセチル体を得る。得られた化合物21より, Ecksteinらの方法 (Luding, J. and Eckstein, F. (1989) J. Org. Chem., 54, 631-635) を応用して, 24の4'-チオUTPを合成する。すなわち, サリチルホスホクロリダイトを用いて23の中間体へと導き, ピロリン酸で処理してシクロトリホスファイト体へ誘導する。次にヨード酸化, 加水分解および脱アセチル化を経て, 目的物の4'-チオUTPを得ることができる。



## 【0023】

4'-チオCTPは、4'-チオシチジンから、塩基をベンゾイル等の保護基で保護した後に、上述の4'-チオUTPと同様の工程により製造することができる。

## 【化25】



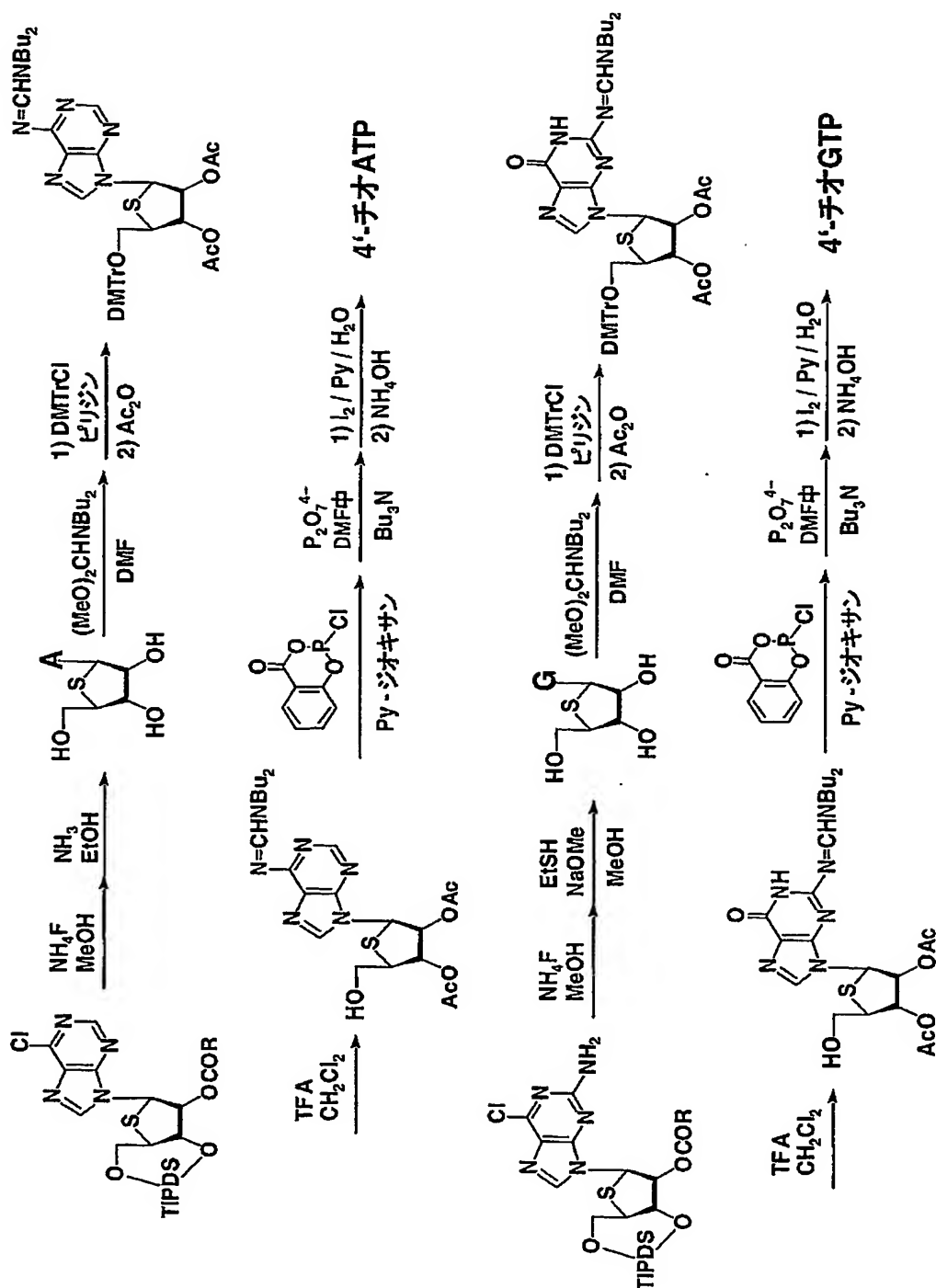
## 【0024】

4'-チオITPは、4'-チオヒポキサンチンから、上述の4'-チオUTPと同様の工程により製造することができる。

## 【0025】

4'-チオATPおよび4'-チオGTPは、以下のスキームにより製造することができる。

## 【化26】



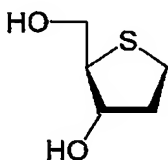
すなわち、2'，3' 位のヒドロキシル基およびプリン環のアミノ基を適切に保護した後、4' -チオCTPの製造と同様に、Ecksteinらの方法（上述）にしたがってサリチルホスホクロリダイトと反応させ、次にピロリン酸と反応させてシクロトリホスファイト中間体を得る。続いてヨード酸化、加水分解および脱

保護を行うことにより、4'-チオATPおよび4'-チオGTPを得ることができる。

#### 【0026】

4'-チオ-2'-デオキシリボヌクレオシド三リン酸は、4'-チオリボヌクレオシド三リン酸と同様に製造することができる。出発物質としては4'-チオ糖

#### 【化27】



を用い、3および5位のヒドロキシル基を適切に保護した後にプンメラー反応を用いて1位に塩基を導入する。次に、サリチルホスホクロリダイトと反応させ、得られた中間体をピロリン酸と反応させ、次にヨード酸化、加水分解および脱保護することにより、目的とする4'-チオ-2'-デオキシリボヌクレオシド三リン酸を得ることができる。

#### 【0027】

本発明の4'-チオヌクレオチド類は、ポリメラーゼを用いるDNAまたはRNAの合成反応の基質として用いることができる。本発明の4'-チオリボヌクレオチドがRNAポリメラーゼにより認識されることを確認するためには、適切なテンプレートの存在下でRNAポリメラーゼを作用させて、4'-チオリボヌクレオチドがオリゴマー中に取り込まれるか否かを調べる。図2に示すように、本発明にしたがって合成した4'-チオUTPはT7RNAポリメラーゼにより認識され、天然のUTPと同様に合成オリゴマー鎖中に取り込まれることが見いだされた。

#### 【0028】

すなわち、本発明の別の観点においては、本発明は、4'-チオヌクレオチド類を用いるオリゴヌクレオチドの製造方法を提供する。オリゴヌクレオチドは、本発明の4'-チオヌクレオシド三リン酸の存在下で、RNAまたはDNA合成

酵素RNAポリメラーゼ，DNAポリメラーゼ等の酵素によりオリゴヌクレオチド鎖を伸長させることにより製造することができる。RNA合成酵素としては，種々の生物に由来する各種のRNAポリメラーゼを用いることができ，DNA合成酵素としては種々の生物に由来するDNAポリメラーゼ，リバーstransクリプターゼ，ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ等を用いることができる。伸長反応の条件は，用いるポリメラーゼにより様々であるが，当業者は適切な反応条件を選択することができる。反応においては，本発明の4'-チオヌクレオシド三リン酸に加えて，天然のヌクレオシド三リン酸または当該技術分野において知られる修飾ヌクレオシド三リン酸が存在していてもよい。

#### 【0029】

本発明の方法により得られるオリゴヌクレオチドは，アンチセンスオリゴヌクレオチド，リボザイム，プライマー，アプタマー，アンチジーン，RNAi，siRNA，プローブ等として，診断，治療および研究試薬として使用することができる。好ましくは，本発明のオリゴヌクレオチドは約6から約50ヌクレオチドの長さである。本発明のより好適な実施態様においては，オリゴヌクレオチドは約12から約20ヌクレオチドの長さである。オリゴヌクレオチドは，修飾された糖，例えば2'位に置換基を有する糖を含んでいてもよく，アデニン，グアニン，シトシン，チミン，ウラシル以外の核酸，例えばヒポキサンチン，5-アルキルシチジン，5-アルキルウリジン，5-ハロウリジン，6-アザピリミジン，6-アルキルピリミジン等を含んでいてもよい。また，ホスホジエステル以外のヌクレオシド間結合，例えばホスホロチオエート結合を含んでいてもよい。

#### 【0030】

本発明のオリゴヌクレオチドは，ヌクレアーゼ耐性および熱安定性が高いため，インビトロおよびインビボにおいて使用するのに適しており，特に遺伝子治療において有用である。

#### 【0031】

##### 【実施例】

以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが，これらの実施例は本発明の範囲を制限するものではない。

実施例においては、次の略号を用いる

Bz ベンゾイル

DMAP 4-ジメチルアミノピリジン

DMBz ジメトキシベンゾイル

MMTr 4-メトキシトリチル

Ms メタンスルホニル

Tf トリフルオロエタンスルホニル

TFA トリフルオロ酢酸

THF テトラヒドロフラン

TIPDS 1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサン-1,3-ジイル

TMS トリメチルシリル

Ts p-トルエンスルホニル

### 【0032】

#### 実施例 1 2,3,5-トリ-0-p-メトキシベンジル-D-リビトール(3)の合成

D-リボース(60 g, 0.4 mol)をアリルアルコール(1.8 L, 26.4 mol)に溶解し、濃硫酸(6.4 mL, 0.12 mol)を0℃にて加え、その後室温にてオーバーヘッドで攪拌した。次いで反応液に重曹を加えて中和し、反応液をセライト濾過した。得られたろ液を減圧下にて溶媒留去し減圧乾燥して、黄色油状の残渣を得た。続いて水素化ナトリウム(64 g, 1.6 mol)のTHF(700 mL)溶液に、0℃下にてDMF(300 mL)に溶解した残渣を3時間かけてカニュレーションした。反応液を再び室温に戻し4時間攪拌した後、再度0℃下にて塩化パラメトキシベンジル(190 mL, 1.4 mol)を10 mL / 15 min の速度で滴下した。100 mL滴下したところで室温に戻しH<sub>2</sub>の発生状況をみながら、慎重に滴下をつづけた。滴下終了後、室温にて攪拌し、13時間後水素化ナトリウム(4.0 g, 0.1 mol)と塩化パラメトキシベンジル(30 mL, 0.22 mol)を加えて24時間攪拌し、反応液を飽和塩化アンモニウム水溶液にて中和した。つづいて酢酸エチルで希釈し、水で分液した。有機層を水(×3)、飽和食塩水(×1)で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>乾燥した。ついで綿栓ろ過後に溶媒を留去し、得られた褐色の残渣を減圧乾燥後、クロロホルム(1.2 L)に溶解し、酸素を封入した。そこに水(800 mL)を加え塩化パラジウム(21.2 g, 0.12 mol)を加え、50

℃にてオーバーヘッドで撹拌した。9時間後に塩化パラジウム(7.0 g, 0.04 mol)を加え, 28時間後に反応液を室温に戻してセライトろ過し, 濃縮した後酢酸エチルで希釈し, 水で分液した。有機層を水(×2), 飽和食塩水(×1)で洗浄し,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 乾燥した。ついで綿栓ろ過後に溶媒を留去し得られた褐色の残渣を減圧乾燥した。残渣を乾燥後, メタノール(1.2 L)に溶解し, アルゴン雰囲気下, 0℃にて水素化ホウ素ナトリウム(30.3 g, 0.8 mol)を加え20分撹拌後, 室温に戻して撹拌した。1時間後, 再び0℃にて水素化ホウ素ナトリウム(7.8 g, 0.2 mol)を加え, 次いで室温に戻して撹拌した。1.5時間後, 反応液の溶媒を留去し, 残渣をメタノールにて2回共沸し, 残渣を酢酸エチルに溶解し水で分液した。有機層を水(×2), 飽和食塩水(×1)で洗浄し,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 乾燥した。ついで綿栓ろ過後に溶媒を留去し, 残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン :  $\text{AcOEt}$  = 5 : 1 → 1 : 1)により精製し, 化合物 3(162.4 g, 79%)を無色透明の油状物質として得た。

$^1\text{H}$  NMR (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.30–6.81 (m, 12H, Ar), 4.66–4.40 (m, 6H,  $\text{CH}_2$ ), 3.94–3.53 (m, 16H, H-1, 2, 3, 4, 5,  $\text{MeO} \times 3$ ), 2.71 (br s, 1H, 4-OH), 2.36 (br s, 1H, 1-OH).

### 【0033】

#### 実施例 2 1,4-アンヒドロ-2,3,5-トリ-O-p-メトキシベンジル-4-チオ-D-リビトール(5)の合成

アルゴン雰囲気下, 化合物 3(162 g, 0.32 mol)のピリジン溶液(900 mL)に0℃にて塩化メシル(122 mL, 1.6 mol)を加え, 同温度で30分撹拌した。次いで反応溶液に氷を加え20分撹拌した。反応溶液を酢酸エチルで希釈し, 水で分液した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(×2), 飽和食塩水(×1)にて洗浄し,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 乾燥した。綿栓濾過後に減圧下溶媒を留去し, トルエンで3回共沸した。残渣を減圧乾燥した後, アルゴン雰囲気下MEK (1 L)に溶解し, 室温にて臭化リチウム(278 g, 3.2 mol)を加えて加熱還流した。12時間後反応液を室温に戻し, 酢酸エチルで希釈し, 水で分液した。有機層を水(×2), 飽和食塩水(×1)にて洗浄し,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 乾燥した。綿栓濾過後に減圧下溶媒を留去し, 得られた残渣を減圧乾燥した後, アルゴン雰囲気下DMF(1 L)に溶解し, 室温にて硫化ナトリウム・九水

和物(92.2 g, 0.38 mol)を加え100℃にて30分撹拌した。次いで反応溶液を室温に戻し、酢酸エチルで希釈し、水で分液した。有機層を水(×2), 飽和食塩水(×1)にて洗浄し, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>乾燥した。綿栓濾過後に減圧下溶媒を留去し, 得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン : AcOEt = 10 : 1 → 1 : 1)で粗精製した後, ヘキサン, 酢酸エチルより再結晶した。化合物 5 (69.1 g, 42%) を白色の結晶として得た。

<sup>1</sup>H NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.26–6.81 (m, 12H, Ar), 4.52–4.38 (m, 6H, CH<sub>2</sub>), 4.01–3.95 (m, 1H, H-2), 3.91 (t, 1H, H-3, J<sub>3, 2</sub> = 4.0, J<sub>3, 4</sub> = 4.0 Hz), 3.80 (s, 9H, MeO×3), 3.66–3.60 (m, 1H, H-4), 3.45–3.40 (m, 2H, H-5a, H-5b), 3.02 (dd, 1H, H-1a, J<sub>1a, 1b</sub> = 10.6, J<sub>1a, 2</sub> = 6.5 Hz), 2.87 (dd, 1H, H-1b, J<sub>1b, 1a</sub> = 10.6, J<sub>1b, 2</sub> = 5.2 Hz).

【0034】

実施例 3 1,4-アンヒドロ-2-0-(4-メトキシベンゾイル)-3,5-0-(1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサン-1,3-ジイル)-4-チオ-D-リビトール(13b)の合成

アルゴン雰囲気下化合物 12(997 mg, 2.5 mmol)のピリジン溶液(15 mL)に0℃にて, 塩化4-メトキシベンゾイル(723 μL, 5.1 mmol)を加え, 室温にて18.5時間撹拌した。反応液に氷を加え10分間撹拌した。次いで, 酢酸エチルで希釈し, 水で分液した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(×3), 飽和食塩水(×1)で洗浄し, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>乾燥した。綿栓濾過後に減圧下溶媒を留去し, トルエンで3回共沸した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン : AcOEt = 50 : 1 → 35 : 1)で精製し, 化合物 13(1.3 g, 96%)を無色油状物質として得た。

FAB-LRMS m/z 527 (MH<sup>+</sup>).

FAB-HLRS 計算値C<sub>25</sub>H<sub>42</sub>O<sub>6</sub>SSi<sub>2</sub> (MH<sup>+</sup>) 527.2319. 実測値527.2311.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.95–6.61 (m, 4H, Ar), 5.71–5.69 (m, 1H, H-2), 4.35 (dd, 1H, H-3 J<sub>3, 2</sub> = 3.5, J<sub>3, 4</sub> = 9.4 Hz), 4.12 (dd, 1H, H-5a, J<sub>5a, 4</sub> = 2.9, J<sub>5a, 5b</sub> = 12.6 Hz), 3.98 (dd, 1H, H-5b, J<sub>5b, 4</sub> = 3.2, J<sub>5b, 5a</sub> = 12.6 Hz), 3.69 (m, 1H, H-4), 3.24 (dd, 1H, H-1β, J<sub>1β, 2</sub> = 3.2, J<sub>1β, 1α</sub> = 12.6 Hz), 3.04 (m, 6H, Me<sub>2</sub>N), 2.91 (d, 1H, H-1α, J<sub>1α, 1β</sub> = 12.6 Hz)

), 1.13-0.87 (m, 28H, TIPDS).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 166.40, 153.59, 131.73, 117.34, 110.94, 110.81, 75.95, 75.21, 60.16, 51.29, 40.44, 31.60, 17.84, 17.77, 17.70, 17.66, 17.52, 17.45, 13.87, 13.75, 13.15, 13.09.

### 【0035】

#### 実施例 4 1,4-アンヒドロ-2-0-(4-ジメチルアミノベンゾイル)-3,5-0-(1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサン-1,3-ジイル)-4-チオ-D-リビトール(13c)の合成

アルゴン雰囲気下4-ジメチルアミノ安息香酸(1.1 g, 6.4 mmol)の塩化メチレン溶液(40 mL)に、塩化チオニル(933  $\mu\text{L}$ , 12.8 mmol)を加えて2時間加熱還流しながら攪拌し、室温に戻して減圧下溶媒を留去した。得られた残渣(533 mg)をアルゴン雰囲気下化合物 12(375 mg, 0.96 mmol)のピリジン溶液(5 mL)に0℃にて加え、室温にて8時間攪拌した。8時間後再び先の残渣を(355 mg)を加え、21時間後ピリジン(5 mL)を加えて50℃にて6時間加熱した。反応液に氷を加え10分間攪拌した。次いで、酢酸エチルで希釈し、水で分液した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液( $\times 3$ ), 飽和食塩水( $\times 1$ )で洗浄し $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 乾燥した。綿栓濾過後に減圧下溶媒を留去し、トルエンで3回共沸した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン: AcOEt = 50 : 1  $\rightarrow$  20 : 1)で精製し、化合物 13c(476 mg, 92%)を無色油状物質として得た。

FAB-LRMS  $m/z$  540( $\text{MH}^+$ ).

FAB-HLRS 計算値 $\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{NO}_5\text{Si}_2$  ( $\text{MH}^+$ ) 540.2635. 実測値540.2637.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.95-6.61 (m, 4H, Ar), 5.71-5.69 (m, 1H, H-2), 4.35 (dd, 1H, H-3  $J_{3,2}$  = 3.5,  $J_{3,4}$  = 9.4 Hz), 4.12 (dd, 1H, H-5a,  $J_{5a,4}$  = 2.9,  $J_{5a,5b}$  = 12.6 Hz), 3.98 (dd, 1H, H-5b,  $J_{5b,4}$  = 3.5,  $J_{5b,5a}$  = 12.6 Hz), 3.69 (m, 1H, H-4), 3.24 (dd, 1H, H-1 $\beta$ ,  $J_{1\beta,2}$  = 3.2,  $J_{1\beta,1\alpha}$  = 12.6 Hz), 3.04 (m, 6H,  $\text{Me}_2\text{N}$ ) 2.91 (d, 1H, H-1 $\alpha$ ,  $J_{1\alpha,1\beta}$  = 12.6 Hz), 1.13-0.87 (m, 28H, TIPDS).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 166.40, 153.59, 131.73, 117.34, 110.94, 110.81, 75.95, 75.21, 60.16, 50.03, 40.44, 31.60, 17.84, 17.77, 17.71, 17.6



7, 17.52, 17.45, 13.87, 13.75, 13.15, 13.09.

【0036】

実施例 5 1,4-アンヒドロ-2-0-(4-メトキシベンゾイル)-3,5-0-(1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサン-1,3-ジイル)-4-チオ-D-リビトール-1-オキシド(14b)の合成

化合物 13b(1.1 g, 2.3 mmol)の塩化メチレン溶液(20 mL)に-78℃にてオゾンガスを20分間バブリングした。反応液にオゾン臭が消えるまでアルゴンをバブリングした後、室温まで昇温した。減圧下溶媒を留去した後、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン: AcOEt = 4 : 1 → 1 : 3)で精製し、化合物 14b(1.0 g, 82%)を無色あめ状物質として得た。

FAB-LRMS  $m/z$  543 (MH<sup>+</sup>).

FAB-HLRS 計算値C<sub>25</sub>H<sub>42</sub>O<sub>7</sub>SSi<sub>2</sub> (MH<sup>+</sup>) 543.2253. 実測値543.2251.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 8.06-6.90 (m, 4H, Ar), 5.84-5.82 (m, 1H, H-2), 4.61 (d, 1H, H-5a, J<sub>5a, 5b</sub> = 12.9 Hz), 4.23 (dd, 1H, H-5b, J<sub>5b, 4</sub> = 2.9, J<sub>5b, 5a</sub> = 12.9 Hz), 4.17 (dd, 1H, H-3 J<sub>3, 2</sub> = 3.5, J<sub>3, 4</sub> = 12.0 Hz), 3.86 (s, 3H, MeO), 3.61 (dd, 1H, H-1 $\beta$ , J<sub>1 $\beta$ , 2</sub> = 5.3, J<sub>1 $\beta$ , 1 $\alpha$</sub>  = 15.5 Hz), 3.48 (dd, 1H, H-4, J<sub>4, 5b</sub> = 2.1, J<sub>4, 3</sub> = 12.0 Hz), 2.93 (d, 1H, H-1 $\alpha$ , J<sub>1 $\alpha$ , 1 $\beta$</sub>  = 15.5 Hz), 1.09-0.87 (m, 28H, TIPDS).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 165.42, 163.84, 132.20, 122.24, 113.96, 73.31, 73.15, 68.48, 55.79, 55.75, 54.59, 17.72, 17.64, 17.58, 17.54, 17.53, 17.49, 17.31, 17.30, 13.81, 13.51, 13.02, 13.00.

【0037】

実施例 6 1-[2-0-(4-メトキシトリチル)-3,5-0-(1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサン-1,3-ジイル)-4'-チオ- $\beta$ -D-リボフラノシル]ウラシル(15b)

アルゴン雰囲気下、ウラシル(408 mg)のトルエン懸濁液(20 mL)に室温にてトリエチルアミン(1.0 mL, 7.3 mmol), TMSOTf(2.6 mL, 14.6 mmol)を加え、反応液が二層の溶液になるまで攪拌した。この反応溶液に塩化メチレン(10 mL)を加え、一層の溶液とし、室温にてこの反応溶液を化合物 14b(987 mg, 1.8 mmol)の塩化メチレン溶液(20 mL)に15分かけて滴下した。続いてトリエチルアミン(1.0 mL

, 7.3 mmol)のトルエン溶液(10 mL)を室温にて5分かけて滴下した。反応溶液に氷を加え, 10分間攪拌した後酢酸エチルで希釈し, 水で分液した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(×3), 飽和食塩水(×1)で洗浄し, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>乾燥した。綿栓濾過後に減圧下溶媒を留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン: AcOEt = 49: 1 → 1: 1)で精製し, 化合物 15b(904 mg, 77%)を白色泡状物質として得た。

FAB-LRMS m/z 637 (MH<sup>+</sup>).

FAB-HLRS 計算値C<sub>29</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>SSi<sub>2</sub> (MH<sup>+</sup>) 637.2435. 実測値637.2435.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 9.28 (br s, 1H, NH), 8.22 (dd, 1H, H-6, J<sub>6, 5</sub> = 8.2), 8.02-6.94 (m, 4H, Ar), 6.01 (s, 1H, H-1'), 5.76 (dd, 1H, H-5, J<sub>5, 6</sub> = 8.2, J<sub>5, NH</sub> = 2.1 Hz), 5.62 (d, 1H, H-2', J<sub>2', 3'</sub> = 3.5), 4.45 (dd, 1H, H-3' J<sub>3', 2'</sub> = 3.5, J<sub>3', 4'</sub> = 9.4 Hz), 4.18-4.06 (m, 2H, H-5'a, H-5'b), 3.87 (s, 3H, MeO), 3.73-3.71 (m, 1H, H-4'), 1.15-0.86 (m, 28H, TIPDS).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 164.01, 163.38, 163.10, 150.13, 140.653, 131.79, 121.73, 113.53, 102.19, 102.17, 78.06, 71.24, 62.54, 57.92, 55.40, 55.39, 50.69, 17.47, 17.36, 17.34, 17.27, 16.99, 16.96, 16.83, 16.79, 13.34, 13.18, 13.10, 13.48.

### 【0038】

#### 実施例7 1-[5-O-(4-メトキシトリチル)-2,3-O-ジアセチル-4'-チオ-β-D-リボフラノシル]ウラシル(20)

アルゴン雰囲気下, 1-(4-チオ-β-D-リボフラノシル)ウラシル(131 mg, 0.5 mmol; 化合物15をNH<sub>4</sub>F/MeOH, MeNH<sub>2</sub>/MeOHで脱保護することにより製造)のピリジン(4 mL)溶液に塩化4-メトキシトリチル(232 mg, 0.75 mmol)を加え, 室温にて14時間攪拌した。アルゴン雰囲気下無水酢酸(188 μL, 2 mmol), DMAP(5 mg, 0.05 mmol)を加え室温にて2時間攪拌した。メタノールを加えて30分攪拌し, 反応液を減圧下溶媒留去した。残渣を酢酸エチルに溶解し, 水で分液した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(×3), 飽和食塩水(×1)で洗浄し, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>乾燥した。綿栓濾過後に減圧下溶媒を留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン: AcOEt = 2: 1 → 1: 1)で精製し, 化合物 20(214 mg, 70%)を無色

透明の固体として得た。

$^1\text{H}$  NMR (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.07 (br s, 1H, NH), 7.77 (d, 1H, H-6,  $J_{6,5} = 7.9$ ), 7.47-6.85 (m, 14H, MMTr), 6.37 (d, 1H, H-1',  $J_{1',2'} = 7.3$ ), 5.68 (dd, 1H, H-2',  $J_{2',1'} = 7.3$ ,  $J_{2',3'} = 4.0$ ), 5.54-5.51 (m, 1H, H-3'), 5.62 (dd, 1H, H-5,  $J_{5,6} = 7.9$ ,  $J_{5,\text{NH}} = 2.6\text{Hz}$ ), 3.81 (s, 3H, MeO), 3.62-3.53 (m, 2H, H-5'a, H-4'), 3.40-3.35 (m, 1H, H-5'b), 2.12-2.00 (m, 6H, AcO  $\times 2$ ).

【0039】

実施例 8 1-(2,3-O-ジアセチル-4'-チオ- $\beta$ -D-リボフラノシル)ウラシル(21)

化合物 20(199 mg, 0.32 mmol)を80%酢酸水溶液に溶解し、室温にて11時間撹拌した。反応液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液に滴下し、酢酸エチルで分液した。水層をクロロホルムで7回抽出し、有機層を飽和食塩水( $\times 1$ )で洗浄し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 乾燥した。綿栓濾過後に減圧下溶媒を留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィ(ヘキサン : AcOEt = 2:1  $\rightarrow$  AcOEt)で精製し、化合物 21(93 mg, 84%)を白色泡状物質として得た。

$^1\text{H}$  NMR (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.23 (br s, 1H, NH), 8.08 (d, 1H, H-6,  $J_{6,5} = 7.9$ ), 6.36 (d, 1H, H-1',  $J_{1',2'} = 7.3$ ), 5.85 (m, 1H, H-5), 5.69 (dd, 1H, H-2',  $J_{2',1'} = 7.3$ ,  $J_{2',3'} = 4.0$ ), 5.49 (m, 1H, H-3'), 4.16-4.04 (m, 1H, H-5'a), 3.86-3.82 (m, 1H, H-5'b), 3.56-3.55 (m, 1H, H-4'), 2.42 (br s, 1H, OH), 2.17 (s, 3H, AcO), 2.06 (s, 3H, AcO)

【0040】

実施例 9 1-(4'-チオ- $\beta$ -D-リボフラノシル)ウラシル 5'-三リン酸 (24)

化合物 21(89 mg, 0.26 mmol)をピリジン共沸し、ピリジン(260  $\mu\text{L}$ )に溶解した。アルゴン雰囲気下、ジオキサン(780  $\mu\text{L}$ )を加え、室温にて撹拌した。サリチルホスホクロリダイト(58 mg, 2.9 mmol)のジオキサン溶液を加えて10分撹拌した。0.5M ビスブチルアンモニウムピロリン酸のDMF溶液(780  $\mu\text{L}$ )を加え、ブチルアミン(260  $\mu\text{L}$ )を素早く加え10分撹拌した。ピリジン/水 (98/2, v/v) 中 1% ヨウ素(5 mL)を加え、5分撹拌した。5%亜硫酸水素ナトリウム水溶液を数滴加え40分撹拌した。反応液にアンモニア水を(8 mL)加え3.5時間撹拌し、減圧

下溶媒留去した。残渣を水300 mLに溶解し、イオン交換クロマトグラフィー(H<sub>2</sub>O → 1N TEAB)にて精製したのち、塩交換カラム(H<sup>+</sup>型)にて精製し、減圧下溶媒留去した。残渣を水5 mLに溶解し、塩交換カラム(Na<sup>+</sup>型)にて精製し、減圧下溶媒留去した。化合物 24(80 mg, 55%)を薄黄色油状物質として得た。

FAB-LRMS m/z 565 (M-3Na<sup>+</sup>).

<sup>31</sup>P-NMR(108 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : -10.27 (d, J = 20 Hz), -10.56 (d, J = 20 Hz), -21.27 (t, J = 20 Hz).

#### 【0041】

#### 実施例 10 T7 RNAポリメラーゼによる4'-チオUTPのRNA鎖への取り込み

実施例 8 で得られた4'-チオUTPを用いて、T7 RNAポリメラーゼを用いた取り込み実験を行った。実験には、T7プロモーター配列を含む二本鎖DNAを用いた(図 1)。ATP, GTP, CTP, UTPすべてのヌクレオチドが存在する場合、図に示される相補的な26 merのRNAが合成されるはずである。

#### 【0042】

反応は、40 mM Tris-HCl, pH8.0, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM スペルミジン, 5 mM DTT, 0.4 mM NTP, 17nM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]GTP, 2.0  $\mu$ M テンプレート DNAおよび100UのT7 RNAポリメラーゼを含む20  $\mu$ L中で行った。NTPはそれぞれ、(1) GTP, (2) GTP + ATP, (3) GTP + ATP + CTP, (4) GTP + ATP + CTP + UTP, および(5) GTP + ATP + CTP + 4'-チオUTPであった。上記の反応溶液を37℃で3時間インキュベーションし、反応を停止した。つづいて、20%変性ポリアクリルアミドゲル(20×40×0.05 cm, 1800 V, 1時間, 1×TEB)にて電気泳動を行い、オートラジオグラフィーにて解析した。

#### 【0043】

結果を図2に示す。レーン1では、Gの2merと3merに対応するバンド、およびラダーが見られた。レーン2では予測された6merで鎖伸長の停止したバンドが観察され、さらに1残基伸長したバンドがわずかに見られた。レーン3では予測された9merで鎖伸長の停止したバンドが観察され、さらに1残基伸長したバンドがわずかに見られた。レーン4では全長産物である26merのバンドが観察された。UTPのかわりに4'チオUTPを用いたレーン5では、レーン4とほぼ同程度の割合で全

長産物のバンドが観察された。すなわち、4'-チオUTPも天然のUTPと同様にT7 RNAポリメラーゼにより基質として認識され、RNA鎖に取り込まれることが示された。

【0044】

【配列表】

Sequence Listing

<110> Genetic Lab Inc.

<120> 4'-thionucleoside

<130> PGL-0003

<160> 1

<210> 1

<211> 39

<212> DNA

<213> T7 phage

<400> 1

cgcgtaatac gactcactata gggtcgtttcc agatacaca 39

【図面の簡単な説明】

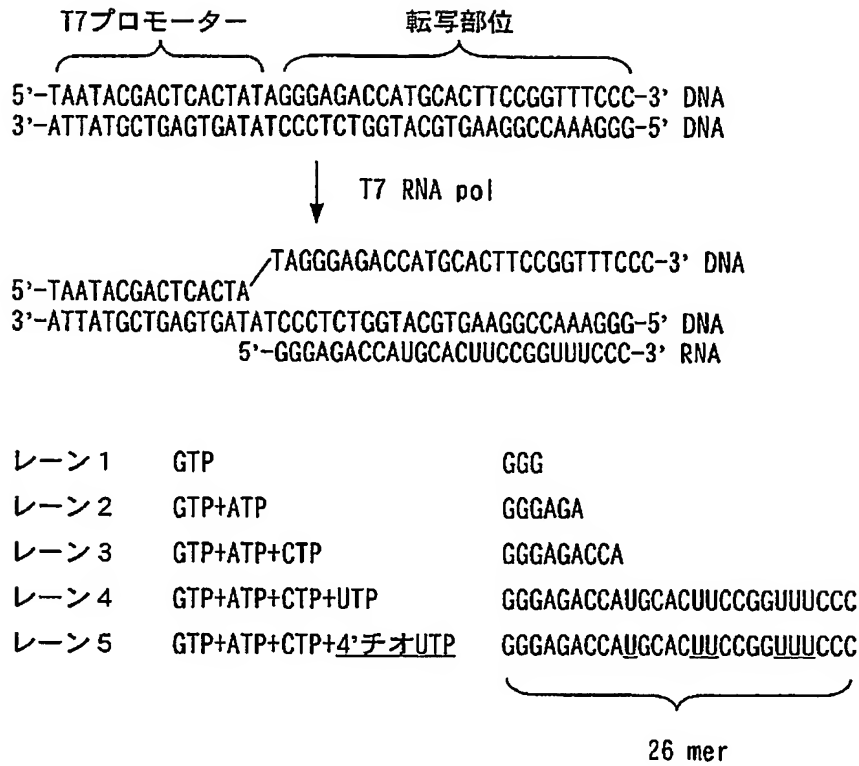
【図1】 図1は、T7 RNAポリメラーゼを用いる4'-チオUTP取り込み実験の概要を示す。

【図2】 図2は、T7 RNAポリメラーゼを用いる4'-チオUTP取り込み実験の結果を示す電気泳動写真である。

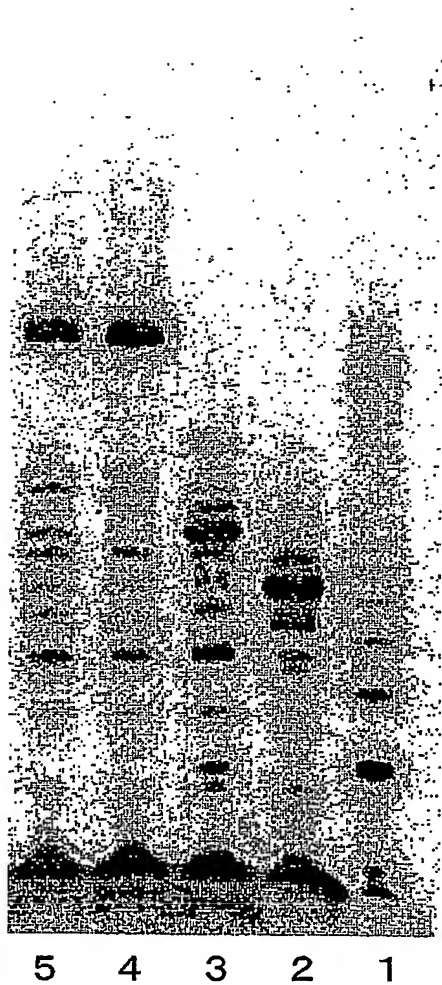
【書類名】

図面

【図 1】



【図 2】



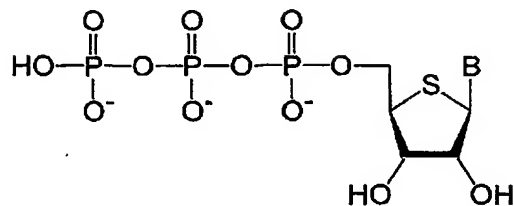
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規ヌクレオシド三リン酸、およびこれを合成する方法、ならびにこれらのヌクレオシド三リン酸を用いてオリゴヌクレオチドを製造する方法を提供すること。

【解決手段】 式 I :

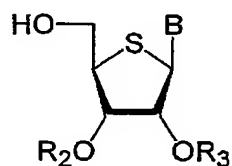
【化 1】



[式中、Bはアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基である]

の化合物、ならびに、式 I の化合物を合成する方法であって、式 I I I :

【化 2】

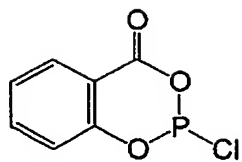


[式中、Bはアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基であり、R<sub>2</sub>およびR<sub>3</sub>はそれぞれ独立してヒドロキシ基の保護基である]

の化合物を、式 I V :



【化3】



の化合物と反応させ、得られた中間体をピロリン酸と反応させ、次にヨード酸化，加水分解および脱保護することにより式 I の化合物を得ることを含む方法。

【選択図】 なし

特願 2002-242259

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[301023364]

1. 変更年月日

2002年 5月21日

[変更理由]

住所変更

住 所

北海道札幌市北区北二十七条西六丁目2番12号

氏 名

株式会社ジェネティックラボ

特願 2002-242259

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[502305630]

1. 変更年月日

2002年 8月22日

[変更理由]

新規登録

住 所

北海道札幌市北区北12条西6丁目 北海道大学大学院薬学研  
究科機能分子設計学講座薬化学分野内

氏 名

松田 彰